

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-135074

(43)Date of publication of application : 13.05.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
A01K 67/027
A61K 45/00
A61P 25/18
A61P 43/00
C12N 5/10
C12Q 1/02

(21)Application number : 2001-339652

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP

(22)Date of filing : 05.11.2001

(72)Inventor : SHIRAO TOMOAKI
SAJI MARI
SEKINO YUKO
KOBAYASHI RIKI

(54) DREBRIN A EXPRESSION-SUPPRESSED ANIMAL NERVE CELL AND NONHUMAN MODEL ANIMAL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an animal nerve cell having reduced function of glutamate receptor, and further to provide a nonhuman model animal developing the symptom of schizophrenia, and a method for screening a prophylactic or therapeutic agent by using the animal nerve cell or the nonhuman model animal.

SOLUTION: This animal nerve cell having the regulated function of the glutamate receptor is produced by suppressing the expression of drebrin A by using an antisense oligonucleotide. The nonhuman model animal having the reduced function of the glutamate receptor and developing the symptom of the schizophrenia is produced by administering a drebrin A-expression-inhibiting material such as the antisense oligonucleotide to the nonhuman animal. These animal nerve cell and the model animal can effectively be utilized for the screening of a promoting agent of the function of the glutamate receptor, or the prophylactic or therapeutic agent of the schizophrenia.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.10.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 14.05.2007

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2007-016437

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 13.06.2007

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-135074

(P2003-135074A)

(43) 公開日 平成15年5月13日 (2003. 5. 13)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 25/18	4 B 0 6 5
A 6 1 P 25/18		43/00	1 1 1 4 C 0 8 4
43/00	1 1 1	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-339652(P2001-339652)

(22) 出願日 平成13年11月5日(2001. 11. 5)

(71) 出願人 396020800
科学技術振興事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(72) 発明者 白尾 智明
群馬県前橋市上小出町1-18-14
(72) 発明者 佐治 真理
神奈川県藤沢市鵠沼海岸6-17-3
(72) 発明者 関野 祐子
東京都世田谷区野毛3-14-15
(74) 代理人 100107984
弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ドレブリンA発現抑制動物神経細胞及び非ヒトモデル動物

(57) 【要約】

【課題】 グルタミン酸受容体の機能を低下させた動物神経細胞、又は精神分裂病徴を発症する非ヒトモデル動物を提供すること、及び該動物神経細胞又は非ヒトモデル動物を用いた、予防或いは治療剤のスクリーニング方法を提供すること。

【解決手段】 アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、ドレブリンAの発現を抑制することにより、グルタミン酸受容体の機能を制御した動物神経細胞を作製することができる。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドのようなドレブリンA発現抑制物質を非ヒト動物に投与することにより、グルタミン酸受容体の機能の低下と共に、精神分裂病徴を発症する非ヒトモデル動物を作製することができる。これらの動物神経細胞及びモデル動物は、グルタミン酸受容体機能亢進剤又は精神分裂病予防或いは治療剤のスクリーニングに有効に利用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ドレブリン A の発現を抑制することによりグルタミン酸受容体の機能を低下させたことを特徴とする動物神経細胞。

【請求項 2】 ドレブリン A の発現抑制が、動物神経細胞にドレブリン A 発現抑制作用を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することにより行われたことを特徴とする請求項 1 記載の動物神経細胞。

【請求項 3】 アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号 1 に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつドレブリン A 発現抑制作用を有することを特徴とする請求項 2 記載の動物神経細胞。

【請求項 4】 アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号 2 に示される塩基配列を有することを特徴とする請求項 2 又は 3 記載の動物神経細胞。

【請求項 5】 動物神経細胞が、中枢神経細胞、抹消神経細胞、又は株化神経細胞であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載の動物神経細胞。

【請求項 6】 神経細胞が、ラット大脳皮質由来であることを特徴とする請求項 5 記載の動物神経細胞。

【請求項 7】 請求項 1～6 のいずれか記載の動物神経細胞を被検物質に接触させ、グルタミン酸受容体機能を測定することを特徴とするグルタミン酸受容体機能亢進物質のスクリーニング方法。

【請求項 8】 請求項 7 により得られたグルタミン酸受容体機能亢進物質を有効成分として含有することを特徴とするグルタミン酸受容体機能亢進剤。

【請求項 9】 ドレブリン A の発現を抑制したことを特徴とするグルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物。

【請求項 10】 ドレブリン A の発現抑制が、動物にドレブリン A 発現抑制作用を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することにより行われることを特徴とする請求項 9 記載のグルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物。

【請求項 11】 アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号 1 に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつドレブリン A 発現抑制作用を有することを特徴とする請求項 10 記載のグルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物。

【請求項 12】 アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号 2 に示される塩基配列を有することを特徴とする請求項 10 又は 11 記載のグルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物。

【請求項 13】 アンチセンスオリゴヌクレオチドを、動物の脳室内に導入したことを特徴とする請求項 10～12 のいずれか記載のグルタミン酸受容体の機能の低下

及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物。

【請求項 14】 非ヒトモデル動物が、ラットであることを特徴とする請求項 9～13 のいずれか記載のグルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物。

【請求項 15】 請求項 9～14 のいずれか記載のグルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物に、被検物質を投与し、グルタミン酸受容体機能を測定するか又は非ヒトモデル動物の精神分裂病徴の発症の状況を評価することを特徴とするグルタミン酸受容体の機能亢進及び／又は精神分裂病の予防又は治療効果を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項 16】 請求項 15 により得られたグルタミン酸受容体の機能亢進及び／又は精神分裂病の予防又は治療効果を有する物質を有効成分として含有することを特徴とするグルタミン酸受容体の機能亢進剤及び／又は精神分裂病予防又は治療剤。

【請求項 17】 被検動物の組織細胞のドレブリン A の遺伝子の異常又はドレブリン A の遺伝子の発現制御の異常を検査することを特徴とする精神分裂病の診断方法。

【請求項 18】 被検動物の組織細胞のグルタミン酸受容体機能の低下を測定することを特徴とする精神分裂病の診断方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ドレブリン A の発現を抑制した動物神経細胞及び非ヒトモデル動物、及び該組織細胞及び非ヒトモデル動物を用いたグルタミン酸受容体機能亢進剤又は精神分裂病予防又は治療剤のスクリーニング方法に関する。更には、被検動物の組織細胞のドレブリン A 遺伝子の異常或いは発現抑制の異常の検査、又は被検動物の組織細胞のグルタミン酸受容体機能の測定を行うことからなる精神分裂病の診断方法に関する。

【0002】

【従来の技術】グルタミン酸は、高等動物の中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であると考えられており、グルタミン酸受容体は中枢における興奮性シナプス伝達に中心的役割を担っている。哺乳類の脳の神経細胞の興奮性信号はグルタミン酸を神経伝達物質として使っている。このグルタミン酸は樹状突起スパイン上に配置されたグルタミン酸受容体を介してシグナルを次の神経細胞に伝達する。グルタミン酸受容体は、イオンチャネルを内蔵して速いシナプス伝達を担うイオンチャネル型グルタミン酸受容体と、G タンパク質と共役することにより間接的にシグナルを伝える代謝調節型グルタミン酸受容体に大別され、イオンチャネル型受容体は、N-methyl-D-asparaginic acid (NMDA) に感受性の NMDA 受容体と非感受性の non-NMDA 受容体に分類される。この non-NM

DA受容体は、更にカニン酸、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) に対する感受性の差により、カニン酸受容体、AMPA受容体のサブタイプに分類される。

【0003】このNMDA受容体、AMPA受容体、代謝調節型グルタミン酸受容体は、ともに脳の高次機能発現に欠くことのできないシナプス可塑性に重要な機能を果たすと考えられているが、その分子基盤についてはまだ完全には解明されていない。神経細胞は、他の体細胞には見られない非常に複雑な形状を有し、核をもつ細胞からは、樹状突起と軸索という2種類の突起が伸びている。樹枝状に伸びる樹状突起はスパイン (spine) と呼ばれる無数の棘構造を有し、他の細胞からの情報を受け取る機能をもつシナプス後部を形成している。この神経細胞特異的な形態は、神経特異的なアクチン結合タンパクにより決定される。このスパインに上記のグルタミン酸受容体が配置されているわけであるが、その配置決定機構として、アクチン細胞骨格との関連が重要だと考えられている。

【0004】一方、本発明者らは、発生過程の神経細胞に多量発現するアクチン結合タンパクドレブリン (Drebrin) を世界に先駆けて発見し (J. Neurochem. 44, 1210-1216, 1985, J. Biochem. 117, 231-236, 1995)、このドレブリンがアクチンファイバーの性状を変えることにより神経細胞の形態形成、特に突起形成に関わっていること (J. Neurosci. Res. 38: 149-159, 1994, Exp. Cell Res. 215:145-153, 1994, J. Biol. Chem. 269:29928-29933, 1994) や、発生中で移動している神経細胞では、細胞体と突起全体に存在するが、成熟した神経細胞では棘構造中に特異的に存在すること (J. Neurosci. 15: 7161-7170, 1996, Dev. Brain Res. 29, 233-244, 1986, Brain Res. 413, 374-378, 1987) を既に証明している。ドレブリンには、胚性型 (embryonic type) のドレブリンEと成体型 (adult type) のドレブリンAという2つのアイソフォームが存在しており (J. Biochem. 117, 231-236, 1995)、成熟した神経細胞のスパインに特異的に見られるドレブリンAは、神経細胞にしか発現しないという特徴を有している (Dev. Brain Res. 29, 233-244, 1986, Brain Res. 413, 374-378, 1987)。

【0005】ドレブリンAはalternative splicing機構によりドレブリンEに“ins2”と呼ばれる領域が加わった配列をしている。すなわち、5'側から956~1093baseにgtcgtccgtactgccctttcataaaggcatcggacagtgggccttcctcctcctcctccttctcctcctcttccctccacggactccctttccctatatcacctggccaccggcaccccaacacctctcttcctcctcctcccat (配列

番号1) が挿入されて発現したものである (Mol. Brain Res. 19, 101-114, 1993, Neuroreport 3, 109-112, 1992)。

【0006】また最近、本発明者らは、ドレブリンAを初代培養神経細胞に発現させると自動的に樹状突起スパインに集まり、しかもその長さを長くすることを見出した。この発見は、ある一つの蛋白合成量を変化させることによってスパインの形態を変化させることができることを発見した世界で最初の報告である (J. Neurosci. 19, 3918-3925, 1999)。その他、ドレブリンの所属するタンパクファミリーに関して、ドレブリンがADF Homology Domainをもったアクチン結合タンパクの一種に分類できる可能性が示唆されている (Mol. Biol. Cell 9, 1951-1959, 1998)。また、ドレブリンのホモログとしてSH3P7が発見されているが、SH3P7の機能が明らかになりつつある (Mol. Cell. Biol. 19, 1539-1546, 1999, Nature Biotech. 14, 741-744, 1996)。

【0007】その他、神経栄養因子BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) を特異ノックアウトするアンチセンスオリゴヌクレオチドを作製し、外来性のBDNFがスパイン密度をインビボ及びインビトロで増加させるエストラジオールの効果を遮断し、選択的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたBDNFの発現抑制がエストラジオールに似た効果をもたらし、抗BDNF抗体によりスパイン密度が増加するなど、スパイン密度の調節に関与するBDNFの役割が明らかにされている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 11412-11417, 1998)。また、脆弱X症候群 (fragile X syndrome) は、X染色体にフラジャイル・サイトが存在するため起こる遺伝性の精神遅滞の原因としては最も頻度の高い病気であり、X染色体上の遺伝子FMR1の発現異常、主に発現欠損により引き起こされ、FMR1の発現異常は脳神経系の形態異常を伴うが、かかる脆弱X症候群などの脳神経疾患の治療法は、現在のところ見つかっていない。

【0008】また、NMDA型グルタミン酸受容体が、その特異的阻害剤によりシナプス活動が抑制されることによりスパインに集積することが、論文で発表されている。論文には、その機構としてcAMP (cyclic adenosine 3', 5'-mono-phosphate) 依存性蛋白リン酸化酵素が重要であることが示されている。その中で、阻害剤投与により集積するグルタミン酸受容体が正常の機能を持っていることが報告されている (J. Neurosci. 21, 5079-5088, 2001)。更に、NMDA型グルタミン酸遮断薬が、分裂病様の陽性症状と抗精神病薬抵抗性の陰性症状の双方を発現させることなどから、分裂病においては、特に脳内ドーパミン伝達の亢進やグルタミン酸伝達の低下の可能性が注目されている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、グルタミン酸受容体の機能を低下させた動物神経細胞、又は

グルタミン酸受容体の機能を低下させた及び／又は精神分裂病徴を発症する非ヒトモデル動物を提供すること、及び該動物神経細胞又は非ヒトモデル動物を用いたグルタミン酸受容体機能亢進剤又は精神分裂病予防或いは治療剤のスクリーニング方法を提供すること、更には、被検動物の組織細胞の遺伝子の異常或いは遺伝子の発現制御の異常の検査、又は被検動物の組織細胞の機能の低下の測定を行うことからなる精神分裂病の診断方法を提供することからなる。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者は、樹状突起スパインのアクチン細胞骨格の調節因子の一つであるドレブリンAの発現量を、アンチセンスオリゴヌクレオチドのようなドレブリンA発現抑制物質を用いて、減少させ、この操作により起こるNMDA型受容体の配置の変化を培養神経細胞を用いて解析し、ドレブリンAの発現を抑制することにより、グルタミン酸受容体の機能を低下させることができることを見い出した。即ち、培養神経細胞を用いた解析により、ドレブリンタンパク質ファミリーおよびその結合蛋白の発現を調節することによりグルタミン酸受容体の機能を制御することが可能であり、グルタミン酸受容体の機能を抑制した神経細胞のような動物神経細胞を作製できることを見い出し、本発明をなした。

【0011】また、本発明においては、ドレブリンA発現抑制物質をラット脳室内に投与したところ、脳内のドレブリンAの発現量を減少させることに成功した。そこで、ドレブリンAの発現を抑制したラットの行動を解析したところ、グルタミン酸受容体の機能の低下と共に、空間記憶形成能力を障害すること無しに、自発運動量の増加や驚愕反応に対するプレパルスインヒビションの衰弱が起きることを確認した。このような行動変化は精神分裂病患者に特有なものであることから、ドレブリンAの発現を抑制すれば、精神分裂病徴発症モデルの作製が可能であることを見い出した。このことより、本発明では、グルタミン酸受容体の機能を低下させ、且つ精神分裂病徴を発症する非ヒトモデル動物を作製した。更に、本発明は、該ドレブリンAの発現を抑制し、グルタミン酸受容体の機能を低下した動物神経細胞及び精神分裂病徴発症モデル動物を用いて、グルタミン酸受容体機能亢進物質又は精神分裂病予防或いは治療効果を有する物質を検索し、グルタミン酸受容体機能亢進剤又は精神分裂病予防或いは治療剤のスクリーニングを行うことよりなる。また、本発明においては、ドレブリンAの遺伝子の異常或いは発現制御の異常と精神分裂病徴の発症との関連、又はグルタミン酸受容体の機能の低下と精神分裂病徴の発症との関連が確認されたことから、被検動物の組織細胞のドレブリンAの遺伝子の異常或いは発現制御の異常の検査、又は被検動物の組織細胞のグルタミン酸受容体機能の低下の測定を行うことにより精神分裂病の診

断を行うことを可能とした。

【0012】すなわち本発明は、ドレブリンAの発現を抑制することによりグルタミン酸受容体の機能を低下させたことを特徴とする動物神経細胞（請求項1）や、ドレブリンAの発現抑制が、動物神経細胞にドレブリンA発現抑制作用を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することにより行われたことを特徴とする請求項1記載の動物神経細胞（請求項2）や、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号1に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつドレブリンA発現抑制作用を有することを特徴とする請求項2記載の動物神経細胞（請求項3）や、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号2に示される塩基配列を有することを特徴とする請求項2又は3記載の動物神経細胞（請求項4）や、動物神経細胞が、中枢神経細胞、抹消神経細胞、又は株化神経細胞であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の動物神経細胞（請求項5）や、神経細胞が、ラット大脳皮質由来であることを特徴とする請求項5記載の動物神経細胞（請求項6）からなる。

【0013】また本発明は、請求項1～6のいずれか記載の動物神経細胞を被検物質に接触させ、グルタミン酸受容体機能を測定することを特徴とするグルタミン酸受容体機能亢進物質のスクリーニング方法（請求項7）や、請求項7により得られたグルタミン酸受容体機能亢進物質を有効成分として含有することを特徴とするグルタミン酸受容体機能亢進剤（請求項8）や、ドレブリンAの発現を抑制したことを特徴とするグルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物（請求項9）や、ドレブリンAの発現抑制が、動物にドレブリンA発現抑制作用を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することにより行われることを特徴とする請求項9記載のグルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物（請求項10）や、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号1に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつドレブリンA発現抑制作用を有することを特徴とする請求項10記載のグルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物（請求項11）や、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号2に示される塩基配列を有することを特徴とする請求項10又は11記載のグルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物（請求項12）や、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、動物の脳室内に導入したことを特徴とする請求項10～12のいずれか記載のグルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物（請求項13）や、非ヒトモデル動物が、ラットであることを特徴とする請求項9～13のいずれか記載のグルタミン酸受容体の機能の低下及

び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物（請求項14）や、請求項9～14のいずれか記載のグルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴発症非ヒトモデル動物に、被検物質を投与し、グルタミン酸受容体機能を測定するか又は非ヒトモデル動物の精神分裂病徴の発症の状況を評価することを特徴とするグルタミン酸受容体の機能亢進及び／又は精神分裂病の予防又は治療効果を有する物質のスクリーニング方法（請求項15）や、請求項15により得られたグルタミン酸受容体の機能亢進及び／又は精神分裂病の予防又は治療効果を有する物質を有効成分として含有することを特徴とするグルタミン酸受容体の機能亢進剤及び／又は精神分裂病予防又は治療剤（請求項16）や、被検動物の組織細胞のドレブリンAの遺伝子の異常又はドレブリンAの遺伝子の発現制御の異常を検査することを特徴とする精神分裂病の診断方法（請求項17）や、被検動物の組織細胞のグルタミン酸受容体機能の低下を測定することを特徴とする精神分裂病の診断方法（請求項18）からなる。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明は、神経特異的アクチン結合タンパクであるドレブリンAの発現を抑制して、グルタミン酸受容体の機能を低下させた動物神経細胞を構築することよりなる。ドレブリンAの発現抑制は、動物神経細胞にドレブリンA発現抑制作用を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することにより行われる。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、配列表の配列番号2に示される塩基配列やその他配列番号1に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつドレブリンA発現抑制作用を有する塩基配列を使用することができる。本発明において使用できるアンチセンスオリゴヌクレオチド、及びその導入方法については、後に詳述する。

【0015】本発明における動物神経細胞としては、例えばラット大脳皮質のような神経細胞が好ましい例として使用できるが、その他の動物神経細胞例としては、大脳皮質以外の中枢神経細胞、末梢神経細胞、及び株化神経細胞などが挙げられる。本発明において、ドレブリンAの発現を抑制した動物神経細胞のグルタミン酸受容体の機能の低下を確認する方法としては、ドレブリンAの発現を抑制した動物神経細胞のグルタミン酸受容体機能を電気生理学的に解析したり、あるいは、グルタミン酸を投与し、投与後のグルタミン酸受容体の消失或いは α -アクチニンの消失を検知する方法などがある。

【0016】次に、本発明は、ドレブリンAの発現を抑制して、グルタミン酸受容体の機能の低下及び／又は精神分裂病徴を発症する非ヒトモデル動物を構築することよりなる。ドレブリンAの発現の抑制には、動物にドレブリンA発現抑制作用を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することにより行われる。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、配列表の配列番号2に示

される塩基配列やその他配列番号1に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつドレブリンA発現抑制作用を有する塩基配列を使用することができる。本発明において使用できるアンチセンスオリゴヌクレオチド、及びその導入方法については、後に詳述する。本発明において、ドレブリンAの発現を抑制するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの非ヒトモデル動物への導入は、例えば、ラットのような動物の脳室内に導入することにより行われる。

【0017】本発明において、ドレブリンAの発現を抑制し、グルタミン酸受容体の機能を低下した動物神経細胞及び精神分裂病徴発症モデル動物を用いて、グルタミン酸受容体機能亢進物質又は精神分裂病予防或いは治療効果を有する物質を検索し、グルタミン酸受容体機能亢進剤又は精神分裂病予防或いは治療剤のスクリーニングを行うには、被検物質を該動物神経細胞に接触させるか或いは該精神分裂病徴発症モデル動物に投与して、グルタミン酸受容体の機能の上昇の測定あるいは精神分裂病徴の軽快の観察を行うことにより実施できる。

【0018】また、本発明においては、ドレブリンの遺伝子の異常或いは発現制御の異常と精神分裂病徴の発症との関連、又はグルタミン酸受容体の機能の低下と精神分裂病徴の発症との関連が確認されたことから、被検動物の組織細胞のドレブリンの遺伝子の異常或いは発現制御の異常の検査、又はグルタミン酸受容体機能の低下の測定を行うことにより精神分裂病の診断を行うことができる。以下に、本発明の実施の形態について更に詳述する。

【0019】（使用するアンチセンスオリゴヌクレオチド）本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、配列番号2に示される塩基配列（5'-AGGAA G G C C C A C T G T C C G A T G C C T-3'）からなるDNAや、配列番号1に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつドレブリンA発現抑制作用を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド（アンチセンスDNA又はアンチセンスRNA）であれば特に制限されるものではないが、生体に投与した際の安定性がより高いという理由でアンチセンスDNAの方が好ましい。

【0020】また、上記ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42℃での洗浄処理や、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65℃での洗浄処理を挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等

のストリンジェンシーを実現することが可能である。このようにして得られるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、12塩基以上39塩基以下、特に15塩基以上25塩基以下のアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAが好ましい。

【0021】(動物神経細胞又はモデル動物へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入) 動物神経細胞又はモデル動物へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入は、この分野で通常用いられる方法を用いることができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、本発明における大脳皮質のような動物神経細胞又はモデル動物の脳室内へ直接投与することができる。また必要に応じて薬学的に許容される細胞内導入試薬、例えば、リポフェクチン試薬、リポフェクトアミン試薬、DOTAP試薬、Tfx試薬、人工合成脂質ベジクル、リポソーム、膜融合試薬、高分子ミセル化試薬、高分子担体、またはその他の細胞内導入試薬とともに投与することができる。この場合、発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、単独でも投与可能であるが、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与する場合には、注射剤のような形で投与することができる。注射剤とする場合には、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを水、生理食塩水またはブドウ糖溶液等に溶解させて調製することができ、必要に応じて緩衝剤、保存剤あるいは安定化剤等を含有させてもよい。

【0022】また、細胞への取り込みの促進や標的とする細胞への指向性を高める目的で、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド配列を発現させるようにデザインされたプラスミドやウイルスベクターを遺伝子治療用のベクターとして用いることもできる。このようなベクターとしては、ヘルペスウイルス(HSV)ベクター、アデノウイルスベクター、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)ベクター等のウイルスベクターを好適に挙げることができるが、これらウイルスベクターの中でもHSVベクターが好ましい。HSVベクターは、神経親和性が高く、HSVが細胞の染色体DNAに組み込まれないため安全であり、また、導入遺伝子の発現期間を調節することが可能である。また、ウイルスベクターを用いる場合、リコンビナーゼが認識する逆方向反復配列、例えば大腸菌P1ファージ由来のloxP配列又は酵母サッカロミセス・セレビツシェ由来の野生型FRT配列を利用すると、所望の時期に本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現させることができる。

【0023】

【実施例】以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例1 (神経細胞の調製、培養)

妊娠20日のSprague-Dawleyラットをエーテル麻酔し、断頭後、胎仔を取り出した。大脳皮質を摘出して髄膜を剥がし、パパイン添加CSF溶液に入れて、37℃恒温槽で15分間放置した。上清を吸引除去し、MEM培地5mlで洗浄し、再度上清を吸引除去した後、MEM培地3mlと馬血清2mlを加えてビペッティングし、神経細胞含有溶液をフィルター濾過してから遠心し、上清を捨て、5%牛血清、5%馬血清を含むMEM培地で攪拌し、直径3.5cmのディッシュ内に3.0×10⁶/2ml(ウェスタンブロット用)、又は2.0×10⁶/2ml(免疫染色用)の濃度で2mlずつそれぞれ注入した。これらディッシュ内の神経細胞をCO₂インキュベーター内で37℃で培養した。5日目以降、Arac5μM入りグリブアコンディション培地を用い、週に2回、培地を半量ずつ交換して培養を継続した。

【0024】実施例2 (神経細胞へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与)

培養開始12日目に、調製したドレブリンA発現抑制物質であるアンチセンスオリゴヌクレオチド5'-AGGAAGGCCCACTGTCCGATGCCT-3' (配列番号2)を最終濃度が10μMになるように、該アンチセンスオリゴヌクレオチド単独、或いはアンチセンスオリゴヌクレオチド(10μM)とグルタミン酸(100μM)を培地内に投与し、その2日後に神経細胞を回収し、免疫染色とウェスタンブロット分析を行った。

【0025】実施例3 (ウェスタンブロット分析)

アンチセンス鎖投与2日後における神経細胞内のドレブリンAタンパクの発現量を調べるために、ウェスタンブロット分析を行った。神経細胞の抽出液をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により分離し、分離したタンパク質をメンブレンフィルター(MILIPORE社製「Immobilon transfer membranes」)にブロッティングした。このブロッティングした膜を、5%スキムミルクを含むTBSで5倍希釈した抗ドレブリンA抗血清(Exp. Cell Res. 215, 145-153 (1994); 抗ドレブリンAポリクローナル抗体)含有溶液中、室温で60分間インキュベーションした。0.05%のツイーン20を含むTBSで洗浄後、5%スキムミルクを含むTBSで希釈したHRP標識化抗ラビットIgG抗体のF(ab')₂フラグメント(カッペル社製)溶液に上記インキュベーションした膜を浸した。抗原特異的HRP反応により生じた化学ルミネッセンスをKodak Scientific Imaging Film(X-OMAT AR, Kodak)とECL detection kit(Amersham Pharmacia Biotech)により視覚化した。その結果、ドレブリンAの発現量を低下させることに有効であることがわかった(図1)。

【0026】実施例4 (免疫染色)

アンチセンス鎖5'-AGGAAGGCCCACTGT

CCGATGCCT-3' (配列番号2) 投与2日後における神経細胞を、3.5%のパラホルムアルデヒドを添加したPBSにより4℃で15分間振盪固定した後、TBS中で室温にて5分間洗浄し、3%のBSAを含むPBS中で室温にて10分間ブロッキングし、更抗ドレブリンA抗血清 (Exp. Cell Res. 215, 145-153 (1994); 抗ドレブリンAポリクローナル抗体) を3%のBSAを含むPBSで希釈して調製した溶液を用いて、室温で60分間反応させた。これら反応させた標本をPBS中で室温にて5分間×3回振盪して洗浄した後、3%のBSAを含むPBSで100倍希釈したFITC標識化抗マウスIgG抗体 (カッペル社製) を用いて室温にて30分間染色した。これら染色物を遮光したままPBS中で室温にて5分間×3回振盪して洗浄した後、パーマフロー (シャンドン社製) で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。この結果を図2に示す。

【0027】実施例5 (グルタミン酸受容体機能の測定)

上記のように調製したドレブリンAの発現を抑制したラット神経細胞について、グルタミン酸受容体の機能についての測定を行った。ドレブリンAの発現を抑制した動物神経細胞のグルタミン酸受容体の機能の低下を確認する方法としては、ドレブリンAの発現を抑制した動物神経細胞に、グルタミン酸を投与し、投与後のグルタミン酸受容体の消失或いは α -アクチニンの消失を、特異抗体を用いた間接蛍光抗体染色法を行って、顕微鏡下で観察した。グルタミン酸受容体の機能が阻害された場合は、グルタミン酸受容体の消失およびアルファアクチニンの消失が起こらなくなるので、この方法によりグルタミン酸受容体の機能を間接的に試験することができる。

(実験結果) 上記試験から、次のような結果が得られ、このことよりドレブリンAの発現を抑制することによって、グルタミン酸受容体の機能の低下が起こっていることが確認された。

(1) ドレブリンAの発現を抑制した結果、グルタミン酸投与後のグルタミン酸受容体の消失が起こらなくなった (図3)。

(2) ドレブリンAの発現を抑制した結果、グルタミン酸投与後の α -アクチニンの消失が起こらなくなった (図4)。

【0028】実施例6 (ドレブリンAの発現を抑制した非ヒトモデル動物の構築)

樹状突起スパインの形態形成を制御しているタンパク質であるドレブリンAのアンチセンスオリゴヌクレオチド5'-AGGAAGGCCCACTGTCCGATGCCCT-3' (配列番号2) を、以下に示す方法によりHVJ-リボソーム遺伝子導入法を用いて、脳室内投与を行うことにより、ラット全脳に導入した。即ち、ドレブリンAのアンチセンスオリゴヌクレオチド (アンチセン

ス) を封入したリボソーム (リン脂質小胞) を作製し、次いでこのリボソームに細胞融合能をもつ不活性化センダイウィルス (HVJ) を融合させて、アンチセンス含有HVJ-リボソーム複合体を作製した。このHVJ-リボソーム複合体は細胞融合能をもち、アンチセンスをはじめとする遺伝子を高効率で細胞に導入するベクターとして働く (HVJ-リボソーム遺伝子導入法)。HVJ-リボソーム遺伝子導入の際には、アンチセンス含有HVJ-リボソーム複合体のサスペンション30 μ l (1.2~3.6 μ gオリゴヌクレオチド) を麻酔下で、ラットの脳室にマイクロシリンジ又はガラスマイクロピペットを用いて圧注入することにより行った。HVJ-リボソームベクターにより脳細胞に導入されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、約2週間に亘って持続的に作用し続けるため、アンチセンス脳内導入ラットの長期に亘る行動実験が可能である。

【0029】実施例7 (ドレブリンAの発現を抑制した非ヒトモデル動物の行動解析)

上記のようにして構築した非ヒトモデル動物について、アンチセンスオリゴヌクレオチド注入後4日目に、いくつかの行動課題を行った。

1. オープンフィールド解析

オープンフィールド解析は以下に示す方法により行った。即ち、ラットにとって新規な環境である白色円形ボックス (直径1.5m、高さ0.5m) の中央に、BS注入コントロールラット (bss) 又はドレブリンアンチセンス注入ラット (dre) を置き、その行動を30分間に亘ってビデオカメラにより記録した。この行動記録から、初期10分間の総移動距離 (total distance) を自発運動量として計測した。また30分間の全行動において、1) 立ち止まりやうずくまりからなる移動停止 (Lying)、2) 直進、方向転換あるいは壁に沿う歩行等からなる移動 (Walking)、3) 口や手足による毛繕い (Grooming) の3タイプの行動にそれぞれ費やされた時間を情動行動の指標として計測した。新規な環境下における自発運動量の測定を行った結果を、図5に示す。オープンフィールド解析の結果、アンチセンスオリゴヌクレオチドを注入し、ドレブリンAの発現を抑制したラットでは、全脳でドレブリンAの発現を抑制した結果、新規な環境下における自発運動量の著明な増加 (多動) が起こった (図5上)。さらに、全脳でドレブリンAの発現を抑制した結果、新規な環境に順応しにくいことからくる毛繕い行動の多発及び移動停止行動の減少 (落着きの無さ) が認められた (図5下)。上記結果より、ドレブリンA発現抑制動物は多動で、かつ新規な環境に順応しにくいと考えられる。

【0030】2. 空間記憶機能解析

モリスの水迷路課題やプローブテストによる空間記憶機能の解析を以下に示す方法で行った。即ち、モリスの水迷路課題では、円形プール (直径1.5m、高さ0.5

m、水深約0.3m)に入れられたラットが、プールの水面下1.5cmに沈められ隠されている透明なプラットフォーム(直径15cm)を見つけ出し、水からプラットフォームに脱出するまでの時間(latency)を計測した。プラットフォームの場所を周囲の視覚の手がかりから空間配置として学習記憶することにより、試行を重ねる毎に水からプラットフォームに脱出する時間が短縮する。1日6回の試行を1セッションとして、5日間5セッション(全30回試行)で、この水迷路課題を無処置ラット(nt)、BSS注入ラット(bss)、逆配列アンチセンス注入ラット(rev)からなる対照群(control)とドレブリンアンチセンス注入ラット(dre)からなる実験群(test)について行った。更に水迷路課題全30回試行の後に、1回のプローブテストを行った。プローブテストは、プラットフォームを取り除いたプールに60秒間ラットを泳がせて、プラットフォームがあった場所を含むプールの4分の1の領域(target quadrant)内での滞在時間を計測し、target quadrantに他の4分の1領域(quadrant)よりも長く滞在するかどうかで、ラットの水迷路課題学習の達成度をチェックした。モリスの水迷路課題やプローブテストによる空間記憶機能の解析結果を、図6に示す。モリスの水迷路課題では、アンチセンスオリゴヌクレオチドを注入したラットと対照との間で、空間記憶形成に差が見られなかった。プローブテストにおいては、アンチセンスオリゴヌクレオチドを注入したラットでは、プラットフォームがあった場所で、滞在時間の延長が見られた。空間記憶機能解析の結果から、アンチセンスオリゴヌクレオチドを注入しドレブリンAの発現を抑制したラットでは、空間記憶機能に障害はみられなかったが、状況変化(プラットフォームの撤去・消失)の認知に異常が認められた。

【0031】3. 驚愕反応解析

プレパルスインヒビション(prepulse inhibition: PPI)テストで、驚愕反応解析を以下に示す方法で行った。即ち、荷重変化モニター用の計測器を内蔵した床からなるテスト箱にラットを入れ、10分間テスト箱に慣れさせた後、背景ノイズ音を聴かせながら5分間新しい環境に順応させた。さらに、驚愕反応を引き起こす音刺激(120デシベル、20ミリ秒)を十分な時間間隔をもって5回与えて、この驚愕音刺激を覚えさせた。次いで、80デシベル、20ミリ秒又は70デシベル、20ミリ秒の先行音刺激(Prepulse: PP)と120デシベル、20ミリ秒の驚愕音刺激(Pulse: P)を100ミリ秒間隔で組み合わせた2種のペアー刺激(80PP+P、70PP+P)、驚愕音刺激のみ(P)、背景ノイ

ズ音のみの4種類の音刺激を用意し、音刺激40回(各音刺激10回×4)をランダムな順序で、平均40秒の間隔をもってラットに与え、驚愕反応の大きさ(荷重の増加)を記録した。上記の先行音刺激(PP)により驚愕音刺激(P)が誘起する驚愕反応に抑制がかかるプレパルスインヒビション反応(prepulse inhibition: PPI)を次の公式に基づき数値化した。

$$\% PPI_{80} = [1 - (80 PP + P) / (P)] \times 100$$

プレパルスインヒビション反応は、先行刺激を伴う驚愕刺激と驚愕刺激そのものとの違いを識別する知覚情報処理の結果の行動表現であり、このPPI反応の減少は、知覚内容を識別する認知機能の障害を意味している。上記のPPIテストをBSS注入ラット(bss)、逆配列アンチセンス注入ラット(rev)からなる対照群とドレブリンアンチセンス注入ラット(dre)からなる実験群について行った。

【0032】PPIテストでは、80デシベルでPPI減少傾向がみられ、70デシベルで有意なPPI減少がみられた。このPPI反応異常(驚愕反応を誘起する刺激に慣れにくい)は、明かな認知機能の障害と見られる。結果を、図7に示す。この結果より、アンチセンスオリゴヌクレオチドを注入し、ドレブリンAの発現を抑制したラットでは、認知障害が生じると考えられる。上記1～3の解析の結果は、非ヒトモデル動物において、ドレブリンAの発現を抑制すると精神分裂病様の行動異常を生ずることが示された。

【0033】

【発明の効果】本発明によりドレブリンAの発現を抑制した動物神経細胞及び非ヒトモデル動物を作製することにより、グルタミン酸受容体の機能を低下させた動物神経細胞、或いはグルタミン酸受容体の機能を低下させた及び/又は精神分裂病徴を発症する非ヒトモデル動物を構築することができる。該動物神経細胞又は非ヒトモデル動物は、グルタミン酸受容体機能亢進物質や精神分裂病予防或いは治療効果を有する物質のスクリーニングに利用することができ、グルタミン酸受容体機能亢進剤や精神分裂病予防或いは治療剤の開発に有用な方法を提供することができる。更には、本発明においては、グルタミン酸受容体の機能の低下と精神分裂病徴の発症との関連を利用して、被検動物の組織細胞のグルタミン酸受容体機能を測定することにより精神分裂病の診断を行うことを可能とする。

【0034】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Animal cells and non-human animals with inhibitory action of DrebrinA expression

<130> A091P23

<140>
 <141>
 <160> 2
 <170> Patent In Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 138
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 1
 gtcgtccgta ctgccctttc ataaaggcat cggacagtgg gccttcctcc tctcctcttt 60
 cctcctcttc ccctccacgg actccctttc cctatatcac ctgccaccgc accccaaacc 120
 tctcttcttc cctcccat 138
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Antisense
 oligonucleotide
 <400> 2
 aggaaggccc actgtccgat gcct

24

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明において、アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入したラット神経細胞の、ドレブリンAタンパクの発現を分析したウエスタンブロット分析の結果を示す図である。

【図2】本発明において、アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入したラット神経細胞の免疫染色の結果を示す図である。

【図3】本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入したラット神経細胞において、ドレブリンAの発現を抑制した結果、グルタミン酸投与後のグルタミン酸受容体の消失が起こらなくなったことを表す写真を示す図である。

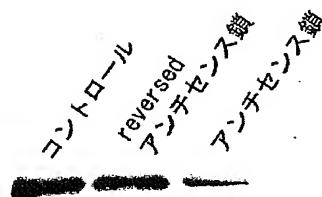
【図4】本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入したラット神経細胞において、ドレブリンAの発現を抑制した結果、グルタミン酸投与後の α -アクチニンの消失が起こらなくなったことを表す写真を示す図である。

【図5】本発明のドレブリンAの発現を抑制したラットにおける行動解析において、新規な環境下における自発運動量の測定を行った結果を示す図である。

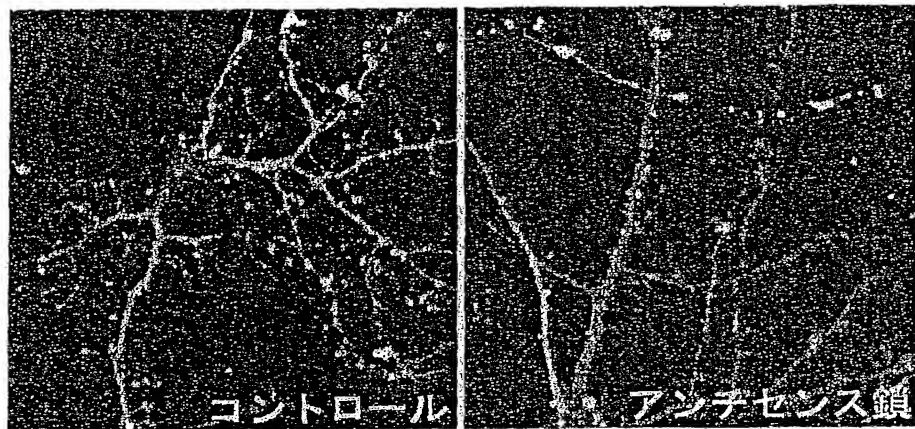
【図6】本発明のドレブリンAの発現を抑制したラットにおいて、モリスの水迷路課題やプローブテストによる空間記憶機能の解析を行った結果を示す図である。

【図7】本発明のドレブリンAの発現を抑制したラットにおいて、プレパルスインヒビション (PPI) テストで、驚愕反応解析を行った結果を示す図である。

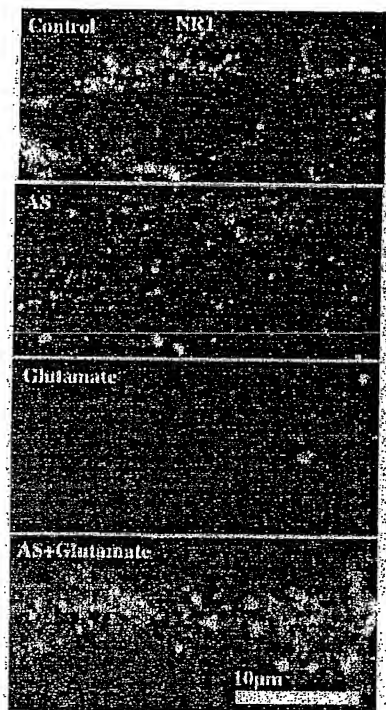
【図1】



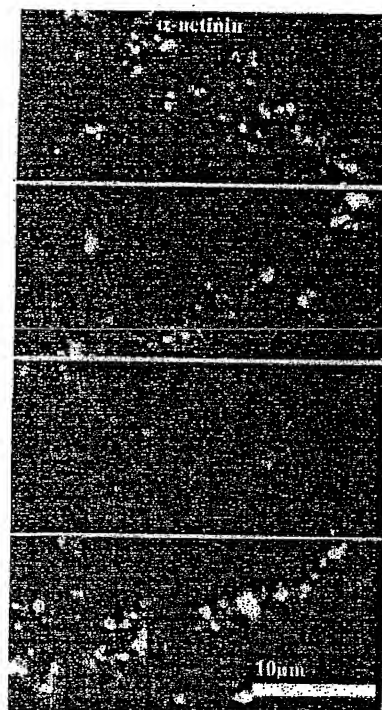
【図2】



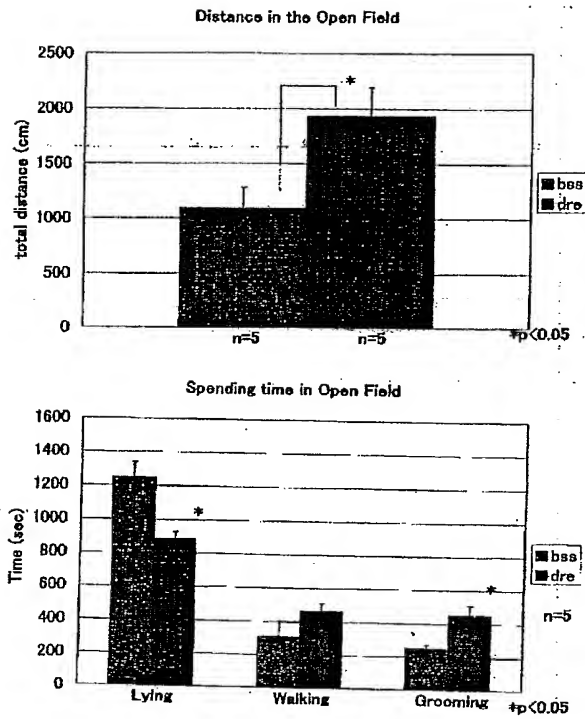
【図3】



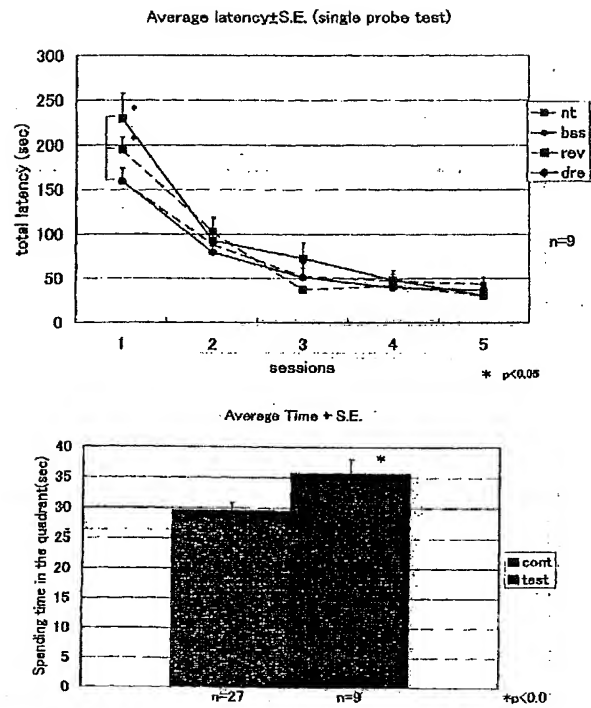
【図4】



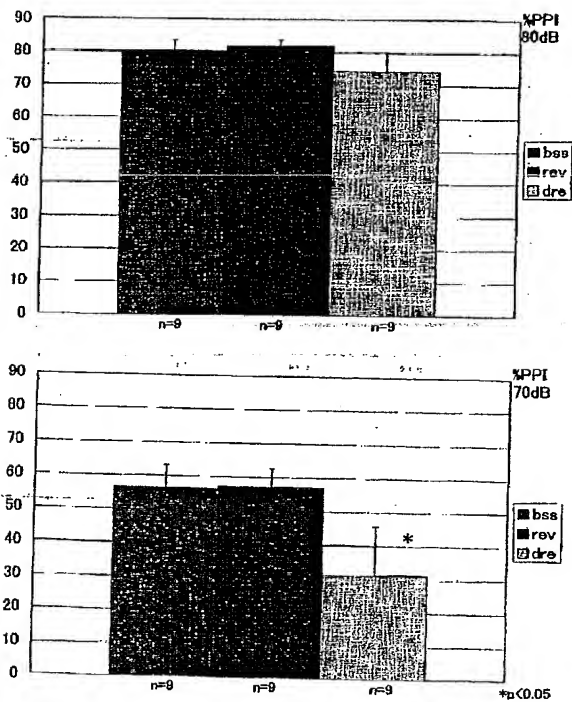
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

C 1 2 N 5/10

C 1 2 Q 1/02

F I

ターム (参考)

C 1 2 N 15/00

Z N A A

5/00

B

(72) 発明者 小林 利佳

東京都小金井市中町 2-1-22

F ターム (参考) 4B024 AA11 BA63 CA01 DA02 GA13

HA15

4B063 QA18 QQ79 QR32 QR77 QR80

QS24 QS28

4B065 AA91X AB01 AC14 CA24

CA46

4C084 AA17 NA14 ZA182 ZC02